

UDK 619:57.089.3:636.2

IN VITRO* PRODUKCIJA GOVEĐIH EMBRIONA ***IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS**

V. Pavlović, Jelena Aleksić**

Biotehnologija se koristi radi poboljšanja produkcije, razvoja životinjskih i farmaceutskih produkata. Manipulacija reproduktivnim procesima je neophodna, kako bi se postigli ovi ciljevi.

Reproduktivna biotehnologija može nezavisno da se koristi ili je povezana sa drugim tehnikama. Tako je, na primer, uspešna kultura embriona u laboratoriji neophodan preduslov za proizvodnju i stvaranje transgenih i kloniranih životinja.

„In vitro” proces produkcije embriona se svodi na tri osnovna koraka:

- 1. sakupljanje oocita od ženke-donatora,*
- 2. fertilizacija oocita u laboratorijskim uslovima,*
- 3. razvoj embriona u medijumu i transfer embriona u recipienta.*

U radu je opisan postupak IVP (in vitro produkcija) goveđih embriona, prednosti i nedostaci ove metode, kao i mogućnosti njene primene u stočarstvu. Ova tehnologija je još uvek nova, pa se i tehnika i medijumi konstantno usavršavaju.

Tehnika fertilizacije oocita krava, kao i njihov razvoj u laboratorijskim uslovima otkriven je 1980. godine, a prvo tele proizvedeno in vitro fertilizacijom (IVF) rođeno je 1982. godine. IVP podrazumeva niz kompleksnih koraka, a ukoliko jedan od njih nije optimalan, to rezultira pojavom malog broja embriona ili ni jednog.

Ključne reči: in vitro produkcija, goveđi embrioni, in vitro fertilizacija

* Rad primljen za štampu 7. 8. 2003. godine. Rad nije lektorisan.

** Dr Vojislav Pavlović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine; Jelena Aleksić, dipl. vet., Beograd

Uvod / Introduction

Biotehnologija se koristi radi poboljšanja genetskih predispozicija, a time i stvaranja jedinki boljih proizvodnih sposobnosti. Ova relativno nova naučna disciplina koristi se sve više u farmaceutskoj industriji. Manipulacija reproduktivnim procesima je neophodna kako bi se postigli ovi, ali i drugi brojni ciljevi.

Reproduktivna biotehnologija, kao jedan od vidova biotehnologije, može nezavisno da se koristi ili je povezana sa drugim tehnikama. Tako je na primer, uspešna kultura embriona u laboratoriji neophodan preduslov za proizvodnju i stvaranje transgenih i kloniranih životinja.

„*In vitro*” znači izvan živog organizma, tj. u laboratorijskim uslovima. Tehnika produkcije preimplantacionih embriona *in vitro* maturacija (IVM), *in vitro* fertilizacija (IVF) primenjuju se u brojnim laboratorijama širom sveta. Embrioni mogu da se proizvedu iz oocita ovarijuma, uzetih i nekoliko sati posle žrtvovanja ili klanja životinje.

Tehnika fertilizacije oocita krava, kao i njihov razvoj u laboratorijskim uslovima otkriven je 1980. godine, a prvo tele proizvedeno *in vitro* fertilizacijom (IVF) rođeno je 1982. godine.

In vitro produkcija (IVP) podrazumeva sprovođenje niza kompleksnih koraka i ukoliko jedan od njih nije optimalno izveden izostaje dobijanje embriona ili je njihov broj mali. Ova tehnologija je još uvek nova, pa se i tehnika i sastav medijuma permanentno usavršavaju.

Potvrđeno je da je dodavanje hormona neophodno za aktiviranje i citoplazmatskog i nuklearnog maturacionog mehanizma oocita, kao i za *in vitro* fertilizaciju i razvoj embriona. Dodavanje seruma i gonadotropnih hormona maturacionom medijumu poboljšava mejotičku maturaciju i posledičnu fertilizaciju, kao i stepen deljenja goveđih oocita, maturiranih i fertilizovanih *in vitro*.

In vitro produkcija uglavnom obuhvata pet osnovnih koraka:

1. sakupljanje oocita od ženke donora (ovum pick up metoda),
2. maturacija oocita,
3. fertilizacija oocita,
4. razvoj embriona u medijumu (*in vitro* kultura),
5. transfer embriona u recipijenta.

Ovum Pick Up (OPU)

Sakupljanje oocita, kao prva faza u *in vitro* produkciji embriona, moguće je izvesti na dva načina.

Prvi se odnosi na sakupljanje oocita od živih donora, a drugi na uzimanje oocita od jedinki neposredno posle klanja ili žrtvovanja.

Sakupljanje od živih donora vrši se upotrebom specijalne vakuum igle koja se *per vaginam* uvodi u jajnike. Manipulacija iglom u cilju usisavanja folikularne tečnosti u kojoj su oociti, kontroliše se ultrazvučnom sondom koja je uve-

dena u rektum. Ovaj postupak može da se ponavlja nekoliko puta tokom nedelje na istoj jedinki. Postupak *ovum pick up* je moguć i kod životinja koje su sterilne, odnosno ne mogu da koncipiraju prirodnim putem, a ni konvencionalnom embrio transfer tehnikom, kao i kod gravidnih krava u periodu između 50 i 120 dana gestacije i junica mlađih od 5 meseci. U poslednje tri godine, tehnika se razvila, pa se sakupljaju jajne ćelije od junica mlađih od dva meseca. U ovim slučajevima, nakon transfera telad se rađaju u vreme kada su njihove genetske majke uzrasta od samo 11 meseci, čime se praktično pruža mogućnost da se od jednog kvalitetnog donora dobije veliki broj potomaka. Kod junica kod kojih ne može da se izvrši rektalna manipulacija, oociti mogu da budu uzeti hirurškim putem-laparoskopijom.

Kolekcija oocita od donora koji su zaklani, ili žrtvovani, sastoji se u sakupljanju njihovih ovarijuma i transportu u termosu sa fosfatnim puferom do laboratorije. Značajno je aspiraciju oocita obaviti najkasnije u vremenu od 6 do 12 časova po uzorkovanju.

Maturacija oocita / *Oocyte maturation*

Dobijeni oociti, stavljaju se u laboratoriji u medijum za maturaciju i inkubiraju u vremenu od 24 sata na temperaturi oko 38,5°C, što je fiziološka telesna temperatura krave. Medijum, pored ostalog sadrži FSH i LH i predstavlja sredinu koja je najbližnja uslovima koji postoje u ovarijumima. Tokom ova 24 časa oociti dostižu zrelost, a kumulusne ćelije ostaju u kontaktu sa oocitima, čineći kumulusno oocitni kompleks (COC).

Ukoliko su oociti sakupljaju od zaklanih ili žrtvovanih jedinki, pre njihove aspiracije, obavezno je u laboratoriji ispiranje jajnika fosfatnim puferom.

Pre postupka maturacije i stavljanja oocita u medijum za sazrevanje, vrši se njihova selekcija u Petri šolji. Oociti se klasifikuju kao – oociti I, II, III i IV klase. Najkvalitetniji su oociti I klase, koje karakteriše brojno prisustvo kumulusnih ćelija. Po izboru sledi ispiranje izdvojenih oocita i stavljanje u maturacioni medijum, a zatim u inkubator, na 38°C stepeni i sredini sa 5% CO₂. Proces IVM traje 24 sata.

Fertilizacija oocita / *Oocyte fertilization*

Posle 24 sata, maturirani kumulusno oocitni kompleks se ispere, otklone se kumulusne ćelije i oociti se prebacuju u fertilizacioni medijum. Dodaje se seme u koncentraciji koja je optimalna za kapacitaciju i fertilizaciju. Ove posude se inkubiraju 18 sati.

Seme koje se koristi za kapacitaciju i fertilizaciju čuva se zamrznuto u tečnom azotu na -196°C, a pre fertilizacije zahteva poseban tretman koji se naziva *swim up* metoda. U ovom procesu, otopljeni sperma se stavlja u poseban kapacitacioni medijum i inkubira jedan sat. Po inkubiranju se centrifugira na 1800

obrtaja tokom 10 minuta, na 22°C. Gornja frakcija se odbacuje, a sediment predstavlja koncentrovanu spermu visokog motiliteta i fertilizacione sposobnosti. Ona se koristi za određivanje optimalne koncentracije spermatozoida, koju je neophodno dodati oocitima u fertilizacioni medijum koja iznosi 1 milion spermatozoida/ml.

Poznato je da za uspešnu koncepciju krava, artificalnom inseminacijom ili prirodnim putem, sperma mora da provede 6 do 8 sati u njenom reproduktivnom traktu pre nego što spermatozoid oplodi jajnu ćeliju. Tokom ovog vremena, prirodne hemijske supstancije slične heparinu dovode do maturacije sperme, koja tek tada može da penetrira jajnu ćeliju. Iz ovih razloga je neophodno u postupku *in vitro* fertilizacije dodati heparin.

Razvoj embriona u medijumu (*in vitro* kultura) /

Embryo development in medium (in vitro culture)

Spermatozoidi se ostavljaju u fertilizacionom medijumu sa jajnim ćelijama oko 24 sata, nakon čega dolazi do fertilizacije jajnih ćelija, koje se sada označavaju kao zigot, a zatim se prebacuju u drugi medijum, gde se nastavlja njihov razvoj.

Kultura je naziv za proces rasta embriona u specijalnom rastvoru. Po fertilizaciji, kada spermatozoid proдре u jajnu ćeliju, zigot je još uvek jedna ćelija. Deli se i nakon 24 sata rezultira pojavom dvoćelijskog embriona. Deoba ćelija se nastavlja i svakih 12 do 24 sata nastaje nova deoba, tako da oko sedmog dana po fertilizaciji, embrion je gradjen od oko 100 do 140 ćelija.

Razvoj embriona se mikroskopski posmatra 3, 7, 8 i 9 dana. Trećeg dana se proverava uspeh fertilizacije, odnosno koliko se oocita u međuvremenu podelilo jednom, dva ili tri puta. Sedmog dana se vide 8 do 16 ćelijskih stadijumi. Zdravi embrioni su tada u stadijumu morule ili rane blastociste. Osmog dana se mogu videti ekspandirane blastociste, a devetog ispijene.

U stadijumu blastociste, sedmog dana, embrion je spreman za transfer u recipijenta kravu, koja je ispoljavala znake estrusa sedam dana ranije.

Transfer embriona u primaoca / *Transfer of embryo into recipient*

Sedmog dana po fertilizaciji, se embrion u stadijumu blastociste prenosi u primaoca. Recipijent se sinhronizuje kako bi se obezbedilo smeštanje embriona *post ovulatio*. Vodi se računa o smeštanju embriona u onaj rog uterusu koji odgovara jajniku gde je *corpus luteum*, odnosno gde se desila ovulacija, kako bi se ubrzalo prepoznavanje graviditeta.

Jedan od najkritičnijih momenata u čitavoj proceduri proizvodnje goveđih embriona je pripremanje medijuma koji se koriste za maturaciju, fertilizaciju i kulturu. Pravi sastav ovih rastvora je od vitalnog značaja za uspeh same me-

tode. Dosadašnji rezultati *in vitro* produkcije embriona su još uvek daleko od optimalnih.

I pored permanentnog nastojanja brojnih istraživača širom sveta da metodu *in vitro* produkcije životinjskih embriona svakodnevno usavršavaju, evidentni su problemi čiji su uzroci još uvek tajna.

Najveći problem u dosadašnjoj primeni ove metode, predstavlja tzv. *large offspring syndrom*. Prvi put je registrovan kod kloniranih krava, 1991. Životinje sa ovim sindromom imaju više kongenitalnih malformacija i veću stopu perinatalnog mortaliteta.

Veliki broj abnormaliteta uključuje skeletne malformacije, nekompletni razvoj vaskularnog sistema i urogenitalnog trakta, disfunkciju imunog sistema, kao i lezije u mozgu.

U slučaju kada telad proizvedena metodom IVP nisu krupna, manje su otporna i javljaju se problemi kao *double-muscling*, problemi sa zglobovima i ekstremitetima, hidroalantois, disfunkcija srca, hipertrofični unutrašnji organi i displazija mozga.

Mehanizmi odgovorni za pojavu ovog sindroma su još uvek nepoznati, ali hromozomske abnormalnosti i poremećaji regulacije rane ekspresije gena i komunikacija između fetusa i primaoca - majke smatraju se najodgovornijim. Takođe i kvalitet oocita može da igra ulogu u pojavi ovog sindroma, kao i drugi razvojni abnormaliteti. Krave koje nose fetuse proizvedene IVP pokazuju abnormalni razvoj placente. Zbog *large offspring syndroma* teško teljenje može da bude značajan problem.

Primena i perspektive / *Implementation and prospects*

Primena *in vitro* produkcije embriona kod goveda ima višestruki praktični značaj koji se uglavnom ogleda u sledećem:

- mogućnost proizvodnje embriona od donora praktično u bilo koje vreme, čak i tokom graviditeta,
- proizvodnja embriona od visokovrednih krava koje su iz različitih razloga morale da budu upućene na klanje,
- proizvodnja embriona za kloniranje i transgene životinje,
- direktan transfer embriona u recipijenta, ili zamrzavanje embriona za budući transfer,
- proizvodnja embriona za osnovna istraživanja.

Kao primenjena tehnologija, embriotransfer pruža mogućnost povećanja broja potomstva superiornih genotipova i izmenu rasnog sastava goveda na određenom geografskom području.

Zaključak / Conclusion

Tehnologija produkcije embriona kod goveda je u razvijenim zemljama sveta u širokoj upotrebi, kako u istraživanjima, tako i u primenjene svrhe. Kad se radi o istraživanjima, primena reproduktivne biotehnologije je od velikog značaja kako bi se našli odgovori na fundamentalna pitanja kontrole endokrinog sistema, molekularnih okidača, pokretača i metaboličkih puteva koji regulišu rani razvoj.

Uspešna *in vitro* produkcija embriona zahteva relativno skupu opremu i obučeno stručno i laboratorijsko osoblje.

Proizvodnja goveđih embriona u Srbiji bila bi moguća u relativno kratkom vremenu ukoliko bi se obezbedilo postojanje pretpostavki za sprovođenje ove savremene grane biotehnologije.

Literatura / References

1. Thomas G. McEvoy, John J. Robinson and Kevin D. Sinclair: Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. J. of Repr. Fert. 2001. - 2. Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G.: Bovine embryo technologies. World Veterinary Congress, Tunis, 2002. - 3. Aleksić Jelena, Stojković M., Wolf E.: Leptin und seine Rollen bei der Reproduktion. Besteht ein praktischer Ansatz, um die *in vitro* Bedingungen zu optimieren. Kongres nemačkog embrio transfera, Bad Waldsee, 20, 21 jun, 2002. - 4. Aleksić Jelena, Wolf E.: Leptin multifunkcionalni proteinski hormon i njegova uloga u reprodukciji. XIV savetovanje veterinara Srbije, 14/16 septembar, 2002. - 5. Ian Lewis: Production of cattle embryos in lab. 2000. - 6. Miljković V., Veselinović S., Kuzmanov D., Mrvoš G., Andrić R., Vujošević J., Veselinović Snežana, Herak M., Vomer I., Varadin M., Košarić D., Šimunić B., Mikulić B., Abram K., Petač D., Perković S., Urošev D., Petrujkić T., Pavlović V., Dobričić D., Torre M.: Mogućnost razvitka i primene embriotransfera i drugih biotehnoških metoda u stočarstvu Jugoslavije. Zbornik VI kongresa veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, 243-257. Zagreb, 1987. - 7. Andrić R., Miljković V., Veselinović S., Mrvoš G., Kuzmanov D., Vujošević J., Pavlović V., Prokić B., Košarčić D., Jordanović B., Vasić J., Savić-Stevanović Vera, Panajotović V., Jakšić Z., Urošević D.: Naša iskustva i rezultati u primeni transfera embriona u goveda. Zbornik radova. Međunarodni simpozijum primena transfera embriona i BLUP metode, Institut za stočarstvo, Zemun Polje. Beograd, 1988. - 8. Miljković V., Veselinović S., Kuzmanov D., Andrić R., Mrvoš G., Petrujkić T., Pavlović V., Košarčić D., Pavlović M., Jakšić Z., Jordanović B., Micić R.: Embriotehnoška ispitivanja kod goveda. IV simpozijum o suzbijanju mastitisa krava radi povećanja proizvodnje i boljeg kvaliteta mleka, Bled, 1989. - 9. Miljković V., Veselinović S., Kuzmanov D., Andrić R., Mrvoš G., Petrujkić T., Pavlović V., Košarčić D., Pavlović M., Jakšić Z., Jordanović B., Micić R.: Embriotehnoška ispitivanja kod goveda. Zbornik predavanja XVIII seminara za inovaciju znanja veterinara. Veterinarski glasnik 8-9, 1989. - 10. Miljković V., Veselinović S., Mrvoš G., Pavlović V., Petrujkić T., Kuzmanov D., Košarčić D., Jordanović B., Micić R.: Naša novija iskustva u embriotransferu kod krava. Vet. glasnik, Vol. 45. No. 6-7, Beograd, 1991. - 11. Pavlović V., Pavlović M.: Bazični principi ultrazvučne dijagnostike. Zbornik plenarnih referata i kratkih sadržaja radova Simpozijuma „Male životinje - život i zdravlje“, sa međunarodnim učešćem. Beograd, 1995. - 12. Pavlović V.: The ultrasound Diagnostics and Pathological Conditions of the reproductive Organs in Domestic Animals. Scientific Review, Series: medical and Biological Sci-

ence, No 17-18. Belgrade, 1996 - 13. Pavlović V., Pavlović M., Zupanc D.: The Ultrasonographic Diagnostics of Physiological and Pathological Conditions in Cow Reproductive Organs Bilateral Veterinary Medical School meeting Belgrade, Thessaloniki. Kopaonik, 1996. - 14. Peševski Z., Pavlović V., Dovenski T., Venev D., Stojkovski J., Tanaskovski S., Zlatanovski S.: Ultrasonografsko ispitivanje na ovarijalnu aktivnost kod anestrični kravi tretirani so GnRH i PGF2a. 5th International Conference for Ovine and Caprine Production. 3rd Symposium on animal Reproduction. Ohrid, 1997. - 15. Pavlović V.: Ultrasonografske biometrijske vrednosti gestacionog meška i embriona krava starih 30 dana. 5th International Conference of Sheep and Goat Production and 3rd Symposium on the Reproduction of domestic animals. Ohrid, Makedonija, (poster) 1997.

ENGLISH

IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

V. Pavlović, Jelena Aleksić

Biotechnology is used for the purpose of improving production, and developing animal and pharmaceutical products. In order to achieve these objectives, it is necessary to manipulate these processes.

Reproductive biotechnology can be used independently, or it can be used in connection with other techniques. Thus, for instance, successful culture of embryos in laboratory conditions is a necessary precondition for the production and creation of transgenic and cloned animals.

The *in vitro* process of embryo production is narrowed down to three basic steps:

1. collecting oocytes from a female donor,
2. fertilization of oocytes under laboratory conditions,
3. growth of the embryo in a medium and transfer of the embryo into the recipient.

The paper describes the IVP procedure (*in vitro* production) of bovine embryos; the advantages and shortcomings of this method, as well as possibilities for its application in cattle breeding. This technology is still quite new, so that both the technique and the mediums are constantly being improved.

The technique of fertilizing bovine oocytes, as well as their development in laboratory conditions was discovered in 1980, and the first calf produced using *in vitro* fertilization (IVF) was born in 1982. IVP implies a series of steps, and if just one of them is not done perfectly, the result is a small number of embryos, or even none at all.

Key words: *in vitro* production, bovine embryos, *in vitro* fertilization

IN VITRO ПРОДУКЦИЯ ГОВЯЖИХ ЭМБРИОНОВ

В. Павлович, Елена Алексич

Биотехнология пользуется с целью улучшения продукции, развития животных и фармацевтических продуктов. Манипуляция репродуктивными процессами необходима, как бы достиглись эти цели.

Репродуктивная биотехнология может независимо пользоваться, или связана с другими техниками. Так, например, успешная культура эбриона в лаборатории необходимо предварительное условие для производства и создание трансгенных и клонированных животных.

"*In vitro*" процесс продукции эмбриона сводится на три основных шага:

1. коллекция ооцитов из самки донора,
2. фертилизация ооцитов в лабораторных условиях,
3. развитие эмбриона в медиуме и трансфер эмбриона в реципиента.

В работе описан поступок *IVP* (*in vitro* продукция) говяжих эмбрионов; преимущества и недостатки этого метода, словно и возможности её применения в животноводстве. Эта технология всё ещё новая, да и техника и медиумы постоянно совершенствуются.

Техника фертилизации ооцитов коров, словно и их развитие в лабораторных условиях нами открыто 1980 года, а первый телёнок произведён *in vitro* фертилизацией (*IVF*) рождён 1982 года. *IVP* подразумевает ряд комплексных шагов, а поскольку один из них не оптимальный, это является результатом явлением маленького числа эмбрионов, или ни одного.

Ключевые слова: *in vitro*, продукция, говяжие эмбрионы, *in vitro* фертилизация